

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-237784

(43)Date of publication of application : 30.08.1994

(51)Int.Cl.

C12P 21/02

C12N 9/50

(21)Application number : 05-028769

(71)Applicant : DAIWA KASEI KK

(22)Date of filing : 18.02.1993

(72)Inventor : NAKANISHI KAZUHIRO
NAGAYASU TAKESHI
SHINNAI TOSHIHIKO

(54) METHOD FOR SYNTHESIZING OLIGOPEPTIDE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an oligopeptide in high purity and yield by reacting a lower alkyl ester or an amide of phenylalanine with an N-substituted aspartic acid under specific conditions.

CONSTITUTION: A lower alkyl ester or an amide of phenylalanine is made to react with an N-substituted aspartic acid in tert-amyl alcohol under the action of an immobilized metallic protease. Thereby, the rate of reaction and reactional yield, etc., of the dehydration condensing reaction are improved.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 18.02.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 17.09.2003

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-237784

(43)公開日 平成6年(1994)8月30日

(51)Int.Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/02		B 8214-4B		
C 1 2 N 9/50		9359-4B		

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 6 頁)

<p>(21)出願番号 特願平5-28769</p> <p>(22)出願日 平成5年(1993)2月18日</p> <p>特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年8月30日、 社団法人化学工学会発行の「化学工学会第25回秋季大会 研究発表講演要旨集」に発表</p>	<p>(71)出願人 390014889 大和化成株式会社 大阪府大阪市天王寺区上本町5丁目7番12号</p> <p>(72)発明者 中西 一弘 岡山県岡山市津島中1丁目2の1-301</p> <p>(72)発明者 長安 武司 岡山県浅口郡里庄町新庄グリーンクレスト 14-7</p> <p>(72)発明者 新内 利彦 大阪府岸和田市南上町2丁目28-16</p> <p>(74)代理人 弁理士 三枝 英二 (外4名)</p>
---	---

(54)【発明の名称】 オリゴペプチドの合成法

(57)【要約】

【構成】本発明は、N-置換アスパラギン酸とフェニルアラニンの低級アルキルエステルもしくはアミドとの脱水縮合反応を、tert-アミルアルコール中、固定化金属プロテアーゼを用いて行なうオリゴペプチドの合成法を提供する。

【効果】本発明によれば、使用酵素の失活を抑制して、安定して高活性を保持し、もって目的オリゴペプチドを、高反応速度で収率よく製造できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 N-置換アスパラギン酸とフェニルアラニンの低級アルキルエステルもしくはアミドとの脱水縮合反応を、tert-アミルアルコール中、固定化金属プロテアーゼを用いて行なうことを特徴とするオリゴペプチドの合成法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はオリゴペプチドの合成法、より詳しくはアスパルテーム前駆体であるオリゴペプチドを固定化金属プロテアーゼを用いて合成する改良された方法に関する。

【0002】

【従来技術とその課題】 従来より、有用ペプチド類の合成法としては、プロテアーゼによる加水分解反応の逆反応を利用する方法（酵素法）が提案されている [J. S. Fruton, Adv. Enzymol., 53, 239 (1982)]。この酵素法は化学合成法に比べて、常温常圧で反応が進行すること、アミノ酸の側鎖官能基を必ずしも保護する必要がないこと、反応が立体選択的に進行し安価なラセミ体原料を使用できること、反応中ラセミ化が起こらないこと等の幾つかの長所を有するが、反面、酵素の基質特異性より目的とするペプチド合成に使用できる酵素の選択が容易でないこと、一般に反応の平衡は基質側（分解反応）に片寄っており、収率、反応速度等が低いこと等の不利があり、工業的実施は尚殆どなされておらず、化学合成法が汎用されている現状にある。

【0003】 本発明者らは、以前より酵素法による有用ペプチド類の製造につき鋭意研究を重ねてきたがその過程で、N-置換アスパラギン酸とフェニルアラニン低級アルキルエステルとの脱水縮合反応を、水と混和しない有機溶媒、即ち酢酸エチル中、水分を含有する固定化金属プロテアーゼの存在下で行なう方法（特開昭55-135595号公報）や上記方法の連続法（特開平2-39895号公報）等を開発した。

【0004】 しかるに、本発明者らは引続く研究の結果、上記各方法において用いた水と混和しない有機溶媒が反応速度、平衡収率、利用酵素の活性や安定性等に非常に重要な役割を果すことを認めると共に、該酢酸エチルに代わって、より酵素の活性及び安定性に優れ、しかも反応速度、平衡収率等の点でも満足のいく新しい有機溶媒としてtert-アミルアルコールが有効であるとの知見を得た。即ち、上記tert-アミルアルコールの利用によれば、利用酵素の安定性が非常に優れ、活性低下も実質的に起こらないことに基づいて、目的とするオリゴペプチドを高純度、高収率で容易にしかも効率よく製造できることを見出した。本発明はこの新しい知見により完成されたものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】 即ち、本発明はN-置換

アスパラギン酸とフェニルアラニンの低級アルキルエステルもしくはアミドとの脱水縮合反応を、tert-アミルアルコール中、固定化金属プロテアーゼを用いて行なうことを特徴とするオリゴペプチドの合成法に係わる。

【0006】 本明細書においてアミノ酸、ペプチド、保護基等の略号による表示は当該分野における慣用記号に従うものとする。

【0007】 本発明方法は、上記の通りN-置換アスパラギン酸とフェニルアラニンの低級アルキルエステルもしくはアミドとの固定化金属プロテアーゼによる脱水縮合反応を、tert-アミルアルコール中で行なう点を特徴とし、これにより、本発明所期の優れた効果を奏し得る。即ち、上記tert-アミルアルコールの利用によれば、酢酸エチルの利用に比して、所望の優れた酵素活性を、広いpH条件及び温度条件下に、長期に亘って安定に保持でき、これによって反応速度、反応収率等を顕著に向上させ得、かくして目的オリゴペプチドを効率よく高純度、高収率で製造することができる。

【0008】 本発明方法においては、tert-アミルアルコールを用いることを必須として、その他は、前述した本発明者らの先の出願に係わる方法と略々同様にして実施することができ、利用する基質、酵素、脱水縮合反応条件等も基本的には同様のものとして行うことができる。

【0009】 例えば本発明方法において一方の基質として利用するN-置換アスパラギン酸のN-置換基は、慣用されるアミノ基保護基のいずれでもよく、代表的にはベンジルオキシカルボニル基（通常Zと略記される）、p-メトキシベンジルベンジルオキシカルボニル基、t-ブトキシカルボニル基等を例示できる。また他方の基質であるフェニルアラニンの低級アルキルエステルもしくはアミドも慣用のカルボキシル保護基、例えばメチル、エチル、プロピル、tert-ブチル基等の炭素数1~4のアルキル基又はアミノ基を有するもののいずれでもよい。之等原料基質はまた通常L-体であるのが好ましいが、特にこれに限定されずD-L-体をも使用できる。

【0010】 また、本発明方法において用いられる固定化金属プロテアーゼとしては、代表的にはサーモライシン等の金属プロテアーゼを、常法に従い適当な支持体（樹脂担体）に固定した各種のものをいずれも使用できる。上記適当な支持体としては市販の各種のもの、例えばアンバーライトXAD-2、アンバーライトXAD-7、アンバーライトXAD-8、アンバーライトIRC-50、アンバーライト200C [以上ローム アンド ハース (Rohm and Haas Co.) 社製]、ダウエックスMSC-1 [ダウケミカル (Dow Chemical Co.) 社製]、メルコゲル [Merckogel SI 1000 A、メルク (Merck) 社製] 等の多孔性樹脂担体を使用できる。之等の内ではアンバーライトXAD-7が高収率を奏し得るため好ましい。上記支持体への酵素の固定は、当分野でよく知られている各種方法に従い得、例えばグルタルアルデヒド

架橋法によるのがよい。該方法におけるグルタルアルデヒド濃度は一般に採用されているそれより高濃度、通常8~20%程度、好ましくは12.5%前後とするのがよく、酵素はNaBr等の適当な溶液に溶解後支持体に吸着固定させるのがよく、かくして、通常支持体1g(湿潤重量)当たり約2~50重量%の酵素が固定され、活性及び安定性の高い所望の固定化酵素を取得できる。

【0011】本発明方法に従う脱水縮合反応は、例えば代表的には各原料基質のtert-アミルアルコール溶液を調製し、これを固定化金属プロテアーゼを充填したカラムに連続的に供給して反応させることにより実施できる。ここで各原料基質のtert-アミルアルコール溶液における各基質濃度は、適宜決定でき、反応速度の面からはできるだけ高濃度(飽和濃度まで)であるのが好ましく、通常フェニルアラニン低級アルキルエステル又はアミドは、約40~200mM程度、好ましくは約100~200mM程度であるのがよく、これと反応させるべきN-置換アスパラギン酸では、上記フェニルアラニン低級アルキルエステル又はアミドの約1/3~1/2倍モル濃度程度の範囲から選択されるのが適当である。

【0012】上記反応はバッチ法でも連続法でも実施でき、特に連続法を採用する場合は、例えば原料液の供給速度約0.5~2ml/時間、滞留時間約5~20時間、使用カラム大きさ約10~20×100~300mm、カラム内固定化酵素充填量約1g(湿潤重量)等とするのが適当である。反応温度としては約20~50℃程度を採用でき、原料液は予めpH5~7.5程度の適当な緩衝液等で飽和させて用いられるのがよい。

【0013】上記反応により目的とするオリゴペプチドをtert-アミルアルコール溶液として得ることができる。目的物質は上記のごとくして得られる反応液より通常の分取操作、濃縮操作、抽出操作等に従い分離でき、必要に応じて常法に従い精製することができる。

【0014】かくして得られるオリゴペプチドは、その有するC-保護基、N-保護基を常法に従い脱離させることによって目的の合成甘味剤であるアスパルテムの前駆体とすることができ、また生理活性を有する各種ペプチド類の合成反応試薬として利用できる。

【0015】

【実施例】以下、本発明を更に詳しく説明するため実施例を挙げる。

【0016】

【実施例1】固定化酵素の調製

サーモライシン[EC3.4.24.4、大和化成社製、力価9470PU/mg]7.5gを5M-NaBr及び16.6mM-CaCl₂を含む1/40Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)120mlに氷冷下に溶解し、この液に固定化担体であるアンバーライトXAD-7(オルガノ社製)30g(湿潤重量)を加え、4℃で17時間静かに振盪しながら酵素を担体に吸着させた。上澄液の残存酵素蛋白量をビュレット法により定量した結果、初発酵素量の約70%が担体に吸着された。

10 【0017】上記上澄液75mlを除去した残りの固定化酵素懸濁液に25%グルタルアルデヒド溶液(ナカライテスク社製)75mlを加え、4℃で約3時間振盪して架橋反応を行ない、その後冷却した0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5、5mM-CaCl₂含有)約1l及び1M-NaClを含む同緩衝液約1lで交互に2回洗浄して、固定化サーモライシン(以下「IMT」という)を得た。該IMTを4℃で保存した。

【0018】

【実施例2】バッチ法による目的オリゴペプチド(Z-L-Asp-L-PheOMe)の製造

tert-アミルアルコールに、緩衝液として5mM CaCl₂を含む50mM MES(2-シアノモルホリノエタンスルホン酸、同仁化学研究所製)-NaOH緩衝液(pH6.0)を4%となる濃度で添加して反応溶媒を調製した。

【0019】バッチ法は、40℃下、激しい攪拌下に、基質としてのL-フェニルアラニンメチルエステル(L-PheOMe、シグマ社製)及びN-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸(Z-L-Asp)をそれぞれ上記溶媒溶液にて200mMの濃度になるように調整し、且つ

30 実施例1で得たIMTを0.067g(湿重量)/mlとなる量で利用して行ない、目的オリゴペプチドとしてのN-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギル-L-フェニルアラニンメチルエステル(Z-L-Asp-L-PheOMe)を合成した。

【0020】尚、比較のため、上記tert-アミルアルコールに替えて酢酸エチルを用いて、同一操作を繰り返した。

【0021】上記バッチ法に従う反応の初速度(mM/hr)、48時間後のZ-Asp-L-PheOMeの収率(%)及び酵素の残存活性(%)を求めた結果を表1に示す。

【0022】

【表1】

使用溶媒	初期反応速度 (mM/hr)	48時間後収率 (%)	残存酵素活性 (%)
tert-アミル アルコール	7.54	71.6	100
酢酸エチル	5.44	42.0	50

【0023】表1中、反応の初速度 (mM/hr) は、上記反応の経時変化の初期勾配から求めた値であり、48時間後のZ-L-Asp-L-PheOMe収率 (%) は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により求めたものであり、酵素の残存活性 (%) は水/有機溶媒2相系におけるZ-PhePheOMe 合成活性 (K.Nakanishi, et al., Bio/technology, 3, 459 (1985)) を調べることにより測定した。

【0024】上記表1より、tert-アミルアルコールの利用によれば、酢酸エチルの利用に比して、酵素の失活を実質的に起こすことなく、高収率でZ-Asp-L-PheOMeを合成できることが判る。

【0025】また、上記バッチ法において、Z-Asp の濃度を80mM、120mM及び200mMのいずれかとすると共に、IMTを0.2g (湿重量) / mlとなる量で利用して、同様の反応を行ない、経時的に生成するZ-L-Asp-L-PheOMeの収率を同様にして求めた。

【0026】50時間迄の反応時間での結果 (収率: Yield) を、図1に示す。

【0027】該図より、Z-Asp の濃度が80mM、120mM及び200mMの場合に、目的物収率は、それぞれ99%、98%及び83%であった、また上記各基質濃度条件下での残存酵素活性は、いずれもほぼ100%であり、いずれの場合も実質的に失活は認められず、非常に安定であった。

【0028】

【実施例3】酵素活性のpH安定性

実施例2において、tert-アミルアルコールに予めpH4~8の50mM MES-NaOH緩衝液4%を加えて、40℃下に7日間保温して反応を行なわせ、酵素の残存活性を実施例2で示した2相系におけるZ-PhePheOMe 合成活性から同様にして求めた。

【0029】得られた各pH条件下での相対残存活性 (Relative remaining activity) を図2に示す。

【0030】尚、図2には上記tert-アミルアルコールに替えて酢酸エチルを用いて行なった同一試験の結果を

併記する。

【0031】図2より、tert-アミルアルコールの利用によれば、pH4~8の範囲でいずれも酵素の失活は認められないことが明らかである。

【0032】

【実施例4】酵素活性の温度安定性

実施例2において、反応温度を40~80℃に変化させる以外は同様として5時間保温し、各温度条件下での相対残存活性を求めた。

20 【0033】得られた結果を図3に示す。

【0034】尚、図3には上記tert-アミルアルコールに替えて、酢酸エチルを用いた場合及びMES緩衝液を用いた場合を併記する。

【0035】図3より、tert-アミルアルコールの利用によれば、40~70℃の温度範囲で酵素の失活は認められないことが明らかである。

【0036】

【実施例5】フロー法によるZ-L-Asp-L-PheOMeの製造
実施例1で得たIMTの0.5g (湿重量) / mlをガラスカラムに充填し、該カラムにL-PheOMe及びZ-L-Aspのそれぞれをtert-アミルアルコールを用いて調整した溶媒溶液 (但しCaCl₂ を含まない) にてそれぞれ200mM及び80mMの濃度に調整した基質溶液を、40℃にて、空間容積 (SV) が43/hrの一定流速で連続的に5時間供給した。その後、固定化酵素をカラムから取り出して、残存活性を調べた。

【0037】尚、比較のため、上記tert-アミルアルコールに替えて酢酸エチルを用いて、同一操作を繰り返した。

40 【0038】上記フロー法による反応5時間後の使用酵素の相対残存活性 (いずれの場合も冷蔵庫に保存してあった固定化酵素の活性を100%とする) を表2に示す。

【0039】

【表2】

7 供給液組成	8 相対残存酵素活性(%)
酢酸エチル＋ 80 mM Z-L-Asp＋ 200 mM L-PheOMe	39
tert-アミルアルコール＋ 80 mM Z-L-Asp＋ 200 mM L-PheOMe	100

【0040】表2からも、本発明方法に従うtert-アミルアルコールの利用が、酢酸エチルの利用に比して、非常に有利であることが明らかである。

【0041】

【実施例6】連続法によるZ-L-Asp-L-PheOMeの製造
実施例1で得たIMTの8g(湿重量)/mlをガラスカラムに充填し、該カラムにL-PheOMe及びZ-L-Aspのそれぞれを、実施例1に従いtert-アミルアルコールを用いて調整した溶媒溶液にて、それぞれ200mM及び120mMの濃度に調整した基質溶液を、空間容積(SV)が1/hrの一定流速で連続的に供給しつつ、4.5℃下に連続反応させて、Z-L-Asp-L-PheOMeを合成した。

【0042】上記連続法による300時間反応の経時的目的Z-L-Asp-L-PheOMeの収率(Yield:%)を求めた結果を図4に示す。

【0043】該図4より、本発明のtert-アミルアルコールの利用によれば、300時間経過後もほぼ一定収率で目的物を合成できることが明らかである。

【0044】

【実施例7】バッチ法による目的オリゴペプチド(Z-L-Asp-L-PheNH₂)の製造
tert-アミルアルコールに5mM CaCl₂を含む5

0mM MES-NaOH緩衝液(pH6.8)を4%、またホルムアルデヒドを10%となる濃度でそれぞれ添加して反応溶媒を調製した。これに基質であるZ-L-AspとL-PheNH₂とをそれぞれ100mMになるように溶解させて基質溶液を調製した。

【0045】実施例1で得たIMTを基質溶液10ml当り2g(湿重量)となる割合で上記基質溶液に添加し、40℃にて激しく攪拌しながら反応を行なわせた。

【0046】24時間反応後の生成Z-L-Asp-L-PheNH₂のHPLCのピーク面積から求められる収率は90%であった。また固定化酵素の残存活性を実施例2と同様にして求めた所、約90%であった。

【図面の簡単な説明】

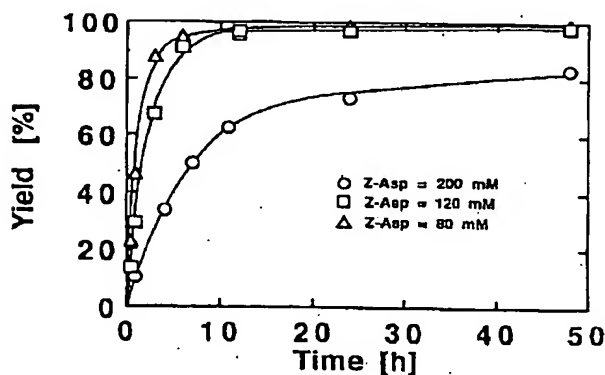
【図1】実施例2に従うバッチ法における目的オリゴペプチドの経時的収率を示すグラフである。

【図2】実施例3に従う酵素活性のpH安定性を調べたグラフである。

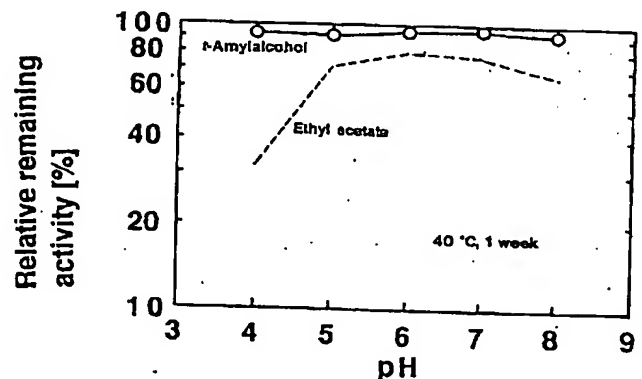
【図3】実施例4に従う酵素活性の温度安定性を調べたグラフである。

【図4】実施例6に従う連続法による目的オリゴペプチド経時的収率を示すグラフである。

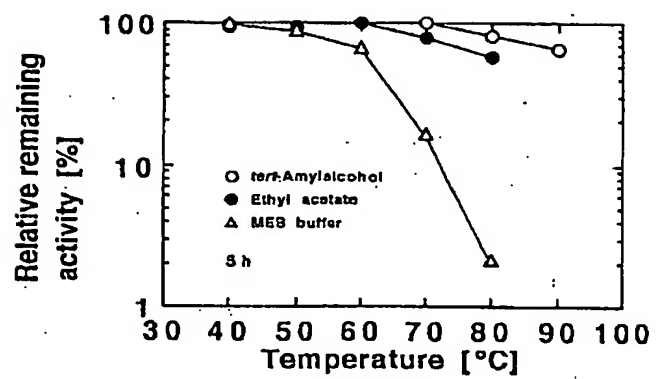
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

